

Novas metodologias de identificação de micro-organismos: MALDI-TOF

New methods of microbiological identification using MALDI-TOF

Jacyr Pasternak*

RESUMO

O diagnóstico rápido de patógenos é crucial para a terapêutica adequada. O método clássico de cultura é preciso e sensível, mas demorado; novos métodos permitem um diagnóstico muito mais rápido, que pode ser tão precoce como 15 minutos após obter um material enriquecido. Em uma hemocultura, por exemplo, é possível saber o agente etiológico nesse prazo, assim que a cultura se mostrar positiva. Esse novo método é o MALDI-TOF, uma aplicação da espectrometria de massa à microbiologia: o material é colocado em uma placa com matriz e bombardeado com um laser que o evapora; um sistema ioniza e aspira o material volatilizado, que chega a detectores, os quais registram o tempo em que a substância chega ao detector e sua quantidade. Cada patógeno tem um espectro característico que é analisado por um *software*.

Descritores: Espectrometria de massa por desorção-ionização de laser em matriz/métodos

ABSTRACT

Rapid diagnosis of pathogens is decisive to guarantee adequate therapy in infections: culture methods are precise and sensitive, but rather slow. New resources are available to enable faster diagnosis, and the most promising is MALDI-TOF technology: mass spectrometry applied to microbiological diagnosis. Times as fast as 10 to 15 minutes to etiological diagnosis are possible after a positive blood culture result. We hope to have this technology in our laboratory, ANVISA permitting and improving their very slow rate of doing things... MALDI-TOF is basically putting a sample of culture or an enriched suspension of the probable pathogen over a small spot with a matrix and vaporizing it with a laser pulse: the products are aspirated into a chamber, ionized and reach detectors at variable times: the detectors show time of arrival and quantity of the product, and each pathogen has its characteristic spectrum analyzed by a software.

Keywords: Spectrometry, mass, matrix-assisted laser desorption-ionization/methods

A identificação microbiológica de fungos e bactérias patogênicos tem sido realizada classicamente por métodos que envolvem cultura e, depois, testes fenotípicos explorando as diferenças metabólicas que existem entre as várias espécies.

Culturas são métodos extremamente poderosos de recuperação de patógenos: teoricamente, um único patógeno viável em meio adequado se multiplica em escala logarítmica, amplificando, assim, o sinal a partir de amostras com pouquíssimos agentes. Entretanto, culturas demoram – dependendo do patógeno, culturas podem ser positivas tão precocemente como quatro a seis horas ou tão demoradas como semanas, e os testes fenotípicos podem demorar mais 24 ou 48 horas. Em algumas circunstâncias, como bacteremias, a identificação e o tratamento adequado (e parece claro que este é decorrência daquela) são críticos: trabalhos já clássicos, como o de Kumar et al., mostram claramente que, a cada hora de demora no tratamento adequado de uma septicemia, a mortalidade aumenta de 10 a 20%⁽¹⁾. O tempo de hospitalização e o preço de uma internação igualmente diminuem com a identificação precoce da etiologia de uma sepse⁽²⁾.

Novos métodos diagnósticos, que não dependam do crescimento da bactéria ou fungo e que inclusive sejam efetivos quando os patógenos não estão viáveis, têm sido desenvolvidos. Os que utilizam ácidos nucleicos já estão em uso clínico, mas, apesar de serem mais rápidos que culturas, demandam tempo de técnico e pelo menos 6 a 8 horas de trabalho, com profissional dedicado. Um grande progresso é o uso de estudos proteômicos para diagnóstico rápido – tão rápido como 5 a 15 minutos – na etiologia de infecções, e é aí que vem o MALDI-TOF.

* Comissão de Infecção Hospitalar, Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil.

Autor correspondente: Jacyr Pasternak – Avenida Albert Einstein, 627, consultório 1.316, 13º andar – Morumbi – CEP: 05651-901 – São Paulo (SP), Brasil – Tel.: (11) 3747-2430 e 3062-0535 – E-mail: jpaster@einstein.br

Data de submissão: 5/1/2012 – Data de aceite: 5/2/2012

Conflitos de interesse: Não há

A sigla MALDI-TOF significa *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight* e consiste num sistema no qual material biológico (uma colônia ou um concentrado de hemocultura) é colocado em uma placa em que há a matriz polimérica. Isso é irradiado com um laser que vaporiza a amostra e há ionização de várias moléculas, que são aspiradas num tubo de vácuo e levadas a um detector: conforme a molécula, o tempo de chegada ao detector (*time of flight*) é diferente. Isso é colocado em gráfico, dando vários picos e, para cada espécie bacteriana ou fúngica, obtém-se um gráfico específico. Uma base de dados computadorizada interpreta e fornece o resultado – tudo com muita rapidez⁽³⁾. Trata-se, portanto, de uma aplicação da espectrometria de massa.

Essa técnica permite diagnósticos microbiológicos complexos, como, por exemplo, a especiação correta dos estafilococos coagulase negativos⁽⁴⁾ ou a sorologicamente lenta e sujeita a erros definição dos vários sorovariantes da *Salmonella* entérica⁽⁵⁾. Diagnóstico de fungos de importância médica é possível⁽⁶⁾ e de micobactérias, com modificações técnicas⁽⁷⁾. À medida que o uso dessa técnica aumenta, os bancos de dados ficam mais completos e a identificação, melhor. Os bancos de dados são proprietários, o que é uma desvantagem quando comparados aos bancos de dados de ácidos nucleicos como o BLAST, que são públicos e de uso livre, mas sujeitos de depósitos errados e alterações. Já os bancos de dados proteômicos, por ora, são mais cuidados e mais bem avaliados antes de serem atualizados. A atualização, aliás, é permanente e faz parte dos contratos de uso das máquinas.

As máquinas já estão em demonstração no Brasil e esperamos que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) não segure o registro, para que possa-

mos contar com esse poderoso recurso, em benefício de nossos pacientes. A microbiologia sempre foi muito lenta, no laboratório clínico, em comparação a outras áreas. Finalmente sentimo-nos em tempo de fornecer um resultado de maneira tempestiva útil – porque pouco adianta explicar para o clínico que nossa bactéria cuidadosamente cultivada é tal depois que o doente faleceu.

Fica o antibiograma, que é um teste tipicamente fenotípico e que exige bactéria isolada, viável e em cultura pura. Esse vai continuar demorando, mas existem evidências de que estudos proteômicos podem, pelo menos, sugerir alguns tipos de resistências.

REFERÊNCIAS

1. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med*. 2006; 34(6):1589-96.
2. Beekmann SE, Diekema DJ, Chapin KC, Doern GV. Effects of rapid detection of bloodstream infections on length of hospitalization and hospital charges. *J Clin Microbiol*. 2003;41(7):3119-25.
3. Benagli C, Rossi V, Dolina M, Tonolla M, Petrini O. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. *PLoS One*. 2011;6(1):e16424.
4. Carpaj N, Willems RJ, Bonten MJ, Fluit AC. Comparison of the identification of coagulase-negative staphylococci by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and tuf sequencing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011;30(10):1169-72.
5. Dieckmann R, Malorny B. Rapid screening of epidemiologically important *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(12):4136-46.
6. Cassagne C, Ranque S, Normand AC, Fourquet P, Thiebault S, Planard C, et al. Mould routine identification in the clinical laboratory by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One*. 2011; 6(12):e28425.
7. El Khéchine A, Couderc C, Flaudrops C, Raoult D, Drancourt M. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification of mycobacteria in routine clinical practice. *PLoS One*. 2011;6(9):e24720.